

## 原 著

機械的刺激を負荷した培養骨芽細胞における  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  交換体の発現と F-アクチン線維の走行性に関する研究

坂井 信裕, 鈴木 恵子, 諸橋 富夫, 山田 庄司

**要旨:** 骨組織が生理的機能を維持するには, 様々な機械的刺激 (メカニカルストレス) が重要である. また細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルは細胞機能に必須のシグナル経路である. 本実験では, 3次元的な機械的刺激を負荷した骨芽細胞様細胞において, イオントランスポーターである 1 型  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  交換体 (NCX1) の発現と, メカノセンシティブに応答し  $\text{Ca}^{2+}$  を流入する伸展活性化 (SA) チャネルの細胞形態変化への関与について検討した. 骨芽細胞様細胞株 (MC3T3-E1 cell) を, ナイロンメッシュで支持したコラーゲンゲル中に播種し ( $6 \times 10^5$  cells/ml), 10%FBS 含有  $\alpha$ MEM 培地にて 24 時間の前培養を行った. その後, 機械的刺激を 3 日間負荷した. 伸展変形は 10%, 断続的な伸展周期は 1 Hz, 15 分間, 1 日 3 回とした. NCX1 mRNA の発現は RT-PCR 法で解析した. 細胞形態は共焦点レーザー顕微鏡により観察した. また, SA チャネルの阻害薬であるガドリニウム ( $\text{Gd}^{3+}$ )  $10 \mu\text{M}$  を培養液中に添加し機械的刺激による SA チャネル活性化への影響を調べた. NCX1 の mRNA 発現は非伸展群と比較して伸展群において増加していた. 伸展群の細胞は紡錘形を呈し, 伸展方向に対し一定方向 (直角) に配列していた. また, F-アクチン線維のローダミンファロイジン染色像は非常に強い蛍光強度を示していた. これらの細胞形態および細胞骨格の変化は  $\text{Gd}^{3+}$  添加により抑制された. 本実験の結果から, 骨芽細胞では機械的刺激により NCX1 を介する  $\text{Ca}^{2+}$  の流出機構が活性化されること, さらに SA チャネル活性化により F-アクチンの構造変化を引き起こし, 細胞形態を変化させることが示唆された.

骨組織が生理的機能を維持するには, 様々な機械的刺激 (メカニカルストレス) が重要であると考えられている. 機械的刺激のシグナルは骨組織中の細胞を介して, シグナル分子の産生や活性化を生じさせると考えられており, その機構を解明する研究が数多く報告されている.

現在までに機械的刺激が骨組織に与える影響を細胞レベルで検討するために *in vitro* においては, 単層培養に対して刺激を与える系として, ①エラスティック膜の伸展変形 (現在, 主流の実験系)<sup>1)</sup>, ②流水圧の負荷 (shear stress)<sup>2,3)</sup>, ③培養液浸透圧を負荷<sup>4)</sup>, ④超音波振動の負荷<sup>5)</sup>, ⑤低出力レーザーの照射<sup>6)</sup> などの実験系が報告されている. しかしながら, 上記実験系は単層培養細胞に対して機械的刺激を与える 2 次元的な系であり, 前述した生理的機能との間に乖離が生じてくることが考えられる. そこで, 我々はナイロンメッシュを支持体としたコラーゲンゲル薄層内に培養細胞を埋入し, 生体に近い環境で機械的刺激を加えるモデルとして, 改良型伸展力反復負荷装置 (以下, 伸展装置) を開発し, 3 次元的な骨系細胞の培養を試みた<sup>7)</sup>. この伸展装置を用いて生後 1 日齢ラット頭蓋冠由来骨芽細胞に最大 7 日間の伸展刺激を加えた結果, 細胞数, DNA 合成, ALP 活性など骨形成

増殖因子が増加し骨形成系に機械的刺激が関与していることを報告した<sup>7)</sup>. 単層培養系で増加が報告されている骨形成因子には, オステオカルシン<sup>8)</sup>, c-fos<sup>8)</sup>, Type-I コラーゲン<sup>9)</sup>, BMP4<sup>10)</sup>, cAMP<sup>11)</sup>, PGE<sub>2</sub><sup>7,11)</sup>, COX-2<sup>8,12)</sup>, カルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) チャネル活性化<sup>4)</sup>, 細胞外シグナル制御キナーゼである ERK のリン酸化<sup>13)</sup>, RhoA<sup>14)</sup> などがあり増殖分化機能を亢進するものが多い.

上述した因子のなかでも,  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルの活性化に伴う細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  シグナル伝達系は細胞機能を調節する上で重要な役割を果たしている. 細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルは, 一般的に細胞膜に存在する  $\text{Ca}^{2+}$  チャネル (電位依存性, 受容体活性化など) や小胞体に存在する  $\text{Ca}^{2+}$  放出チャネル (IP<sub>3</sub> 受容体, リアノジン受容体など) により引き起こされ, 細胞膜および小胞体の  $\text{Ca}^{2+}$  トランスポーター ( $\text{Ca}^{2+}$  ポンプ,  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  交換体など) により終結する. これらの  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルのなかで, 細胞が機械的な刺激を受けた際, 細胞内情報に変換する機構の 1 つとして伸展活性化あるいは機械受容 (stretch activated: SA) チャネルと呼ばれるイオンチャネルが注目されている. このイオンチャネルは細胞膜伸展で生じる膜張力に開閉が制御されており, カチオンチャネルとして  $\text{Ca}^{2+}$  流入系チャ

ネルであることがわかっている<sup>15,16</sup>。一方、ナトリウムイオン ( $\text{Na}^+$ ) と  $\text{Ca}^{2+}$  を交換輸送する細胞膜イオントランスポーターである  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  交換体 (NCX) が知られている。  $\text{Na}^+$  と  $\text{Ca}^{2+}$  の交換は、膜電位と細胞内外の  $\text{Na}^+$  濃度勾配の変化により、  $\text{Ca}^{2+}$  排出、  $\text{Ca}^{2+}$  流入の両方向性に働く。哺乳類には3種類の NCX 遺伝子の存在が報告されている。1型 NCX (NCX1) は心臓、脳、腎臓、血管など様々な臓器に発現している。NCX2, NCX3 は主に脳、骨格筋に発現している<sup>17</sup>。骨芽細胞にも NCX1 および NCX3 が発現している<sup>18</sup>。NCX と細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルの関係に着目した研究では、心筋細胞<sup>19</sup> や血管内皮細胞<sup>20</sup> といった持続的な機械的刺激 (細胞伸展) を受けている細胞を用いた成績が多く報告されている。しかし間歇的な刺激を受けている骨系細胞における細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルの解析<sup>12</sup> はまだ少ない。

今回、我々は骨芽細胞様細胞 (MC3T3E-1) を用いて、機械的伸展刺激によって引き起こされる細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  シグナル伝達経路における細胞機能応答について、イオントランスポーターである NCX1 の発現と、メカノセンサーである SA チャネルの関与に焦点を絞り実験を行った。

## 材料と方法

### 1. コラーゲンをういた3次元培養法

細胞は骨芽細胞様細胞株 MC3T3E-1 (No.RCB1126, 理研 Cell バンク) を使用した。Collagen 溶液は Sakai ら<sup>7</sup> の方法に準じ、0.3% Cellmatrix Type I-A (Nitta Gelatin Co., Osaka), 5 倍濃度  $\alpha$ MEM (Wako Ltd., Osaka), 100 U/ml ペニシリン G (Meiji Seika Co., Tokyo), 100  $\mu\text{g}$  ストレプトマイシン (Meiji Seika Co.), 2 倍再構成緩衝液 (0.05 N 水酸化ナトリウム溶液, 重炭酸ナトリウム溶液, 20 mM HEPES) で調整した。このコラーゲン溶液に細胞を混合し、最終細胞濃度は  $6 \times 10^5$  cells/ml として、ナイロンメッシュストリップス (66 mm  $\times$  14 mm) に播種した。37°C, 5%  $\text{CO}_2$  インキュベーター (Forma Co., USA) で 20 分間ゲル化後、伸展力反復負荷装置に装着した。10% FBS (SAFC Biosciences, Inc., Lenexa, KS, USA) および 100 U/ml ペニシリン G, 100  $\mu\text{g}$  ストレプトマイシン含有  $\alpha$ MEM 中で 24 時間前培養後、機械的伸展刺激を負荷した。

### 2. 機械的伸展力刺激

機械的伸展力刺激を負荷するため、当研究室で開発した伸展装置 (伸展力反復負荷装置 type 2) を用いた<sup>7</sup> (Fig. 1 および 2)。機械的刺激条件は伸展量 (10%), 伸展周期 (1 Hz), 伸展時間 (15 分間, 1 日 3 回) とした。コラーゲンを伸展刺激 (stretched) する群を実験群 (Str. 群) とした。また培養液の攪拌による影響を確認する

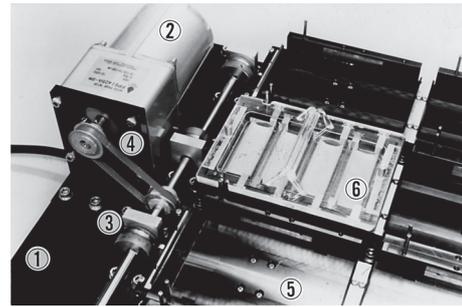


Fig. 1 Appearance of the force-generating apparatus. A waterproof motor (2) and cam (3), connected with the motor via a belt (4), are fixed on a base (1). A movable holder (5), on which a removable unit (6) can be attached, is driven back and forth by the cam shaft.

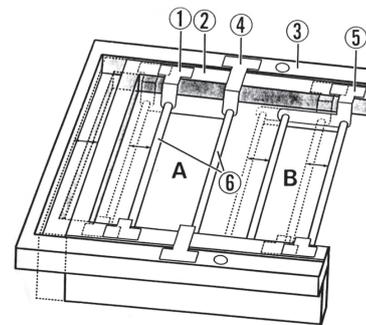


Fig. 2 Schematic diagram of the unit (Fig. 1 6). In the stretched group (A), one of the two stainless-steel wires (6), is attached to a hook (1) on a movable frame (2) and the other is attached to a hook (4) on a fixed frame (3). In the shaken group (B), both of the stainless-steel wires are attached to hook (5) on the movable frame (2) at a constant distance (14 mm) from each other.

ため、コラーゲンを水平移動 (shaken) させる群とした Sha. 群を設定した (Fig. 2)。対照群として、伸展刺激を負荷せずコラーゲンの静置培養 (stationary) を行った群 (Sta. 群) を設定し、計 3 群で実験を行った。伸展刺激の実験期間は刺激開始から 3 日または 5 日間とした。また、Sha. 群は NCX1 mRNA 発現実験のみで設定した。

### 3. RT-PCR 法

コラーゲン試料は、0.2% コラゲナーゼにより酵素処理 (37°C, 20 分間) を行った。採取した細胞を用いて、以下の方法により NCX1 mRNA の発現を同定した。total RNA は RNeasy mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて抽出した。cDNA は total RNA (10  $\mu\text{g}$ ) から逆転写酵素 SuperScript (Gibco BRL, Grand Island,

NY, USA) と random primer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて合成した. この cDNA を鋳型として, AmpliTaq DNA Polymerase (Roche Molecular Systems Inc., Alameda, CA, USA) を用いて, 30 サイクル (94°C・60 秒間, 60°C・120 秒間, 72°C・180 秒間) の条件下にて遺伝子増幅を行った.

NCX1 Primer<sup>21)</sup>

sense:1981-2001;5'-AATGAGCTTGGTGGTGGCTTCACA-3'  
antisense:2827-2844;5'-CCGCCGATACAGCAGCC-3'

得られた PCR 産物はエチジウムブロマイド含有 1.5% アガロースゲルにて電気泳動を行い, トランスエルミネーターにて観察し写真撮影を行った.

#### 4. 細胞形態応答 (組織学的観察)

メカノセンシティブに応答する SA チャネルの影響を調査するため, 阻害剤であるガドリニウム ( $Gd^{3+}$ )  $10 \mu M$  を各群に添加した. 伸展刺激開始 3 日目にコラーゲンゲル試料を採取し, 2%パラホルムアルデヒド固定. 0.1% トライトン X-100 で 10 分間処理した後,  $0.3 \mu M$  ローダミンファロイジンを用いてアクチン染色を施し, 位相差顕微鏡 (Axiophot: Zeiss, Germany) にて蛍光顕微鏡観察した. さらに共焦点レーザー顕微鏡 (MRC500: Bio-Rad) にて励起光 (488/568 nm), 蛍光強度 ( $522 \pm 12.5$  nm),  $2 \mu m$  間隔で断層撮影し, 得られた画像は, 3 次元構築ソフト (VoxBlast, Vaytek Inc., Fairfield, IA, USA) を使用して, ボリュームレンダリング法により 30 枚重ね合わせて 3 次元画像を構築し立体構築画像を作成した.

## 結 果

### 1. NCX1 mRNA の発現

RT-PCR 法により, 細胞内  $Ca^{2+}$  濃度を調節するイオントランスポーターである NCX1 の mRNA を検索した. 対照群である静置培養 (Sta.) 群では, 培養 3 日目に NCX1 mRNA の発現は認められなかったが, 伸展刺激 (Str.) 群と水平移動 (Sha.) 群では, 培養 3 日目に NCX1 mRNA の発現が検出された. また, Str. 群のみ 5 日間の培養を試みたところ, 培養 3 日目と同様の mRNA 発現が観察された (Fig. 3).

### 2. 伸展刺激による SA チャネルの影響 (位相差蛍光顕微鏡像)

伸展刺激 3 日目の骨芽細胞を用いて, ローダミンファロイジンによる F-アクチン線維の蛍光染色による顕微鏡観察を行った. 伸展刺激を付与しなかった Sta. 群では, 細胞の 3 次元的配列に規則性はみられなかった. 一方, 伸展刺激を付与した Str. 群の細胞は伸展方向に対し, ほぼ直角に 3 次元的配列を示した. この規則的配列

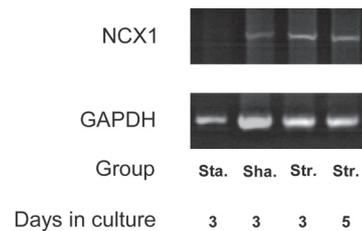


Fig. 3 The effect of the mechanical stimulation (1 Hz for 15 min, three times a day) on the  $Na^+/Ca^{2+}$  exchanger (NCX1) mRNA expression level was assessed using standard RT-PCR in osteoblastic cells (MC3T3E cells). The cells were embedded in the collagen gel supported by the nylon mesh, and cultured for three or five days with or without mechanical stimulation. NCX1 mRNA expression was clearly stimulated in the stretched group (Str.) and shaken group (Sha.) but not in the stationary group (Sta.). GAPDH served as an endogenous control.

に沿った形で細胞形態は細長い紡錘型に観察された. さらに, Str. 群では F-アクチンの蛍光が明瞭に観察された. この F-アクチンの走行を共焦点レーザー顕微鏡により観察したところ, 細胞の形態変化が, F-アクチンによって支持されていることが示唆された. 上記のような伸展刺激による細胞の形態変化, 規則的な細胞の配列および F-アクチンの明確な蛍光とその走行性は Sta. 群ではみられなかった.

SA チャネルは  $Ca^{2+}$  を積極的に流入するチャネルである. SA チャネル阻害薬である  $Gd^{3+}$  の培養液中への添加は Str. 群における伸展刺激の影響を完全に抑制した. 一方, Sta. 群へ  $Gd^{3+}$  添加したことによる細胞形態や配列, F-アクチンへの影響は観察されなかった (Fig. 4 および 5).

## 考 察

NCX は 3 個の  $Na^+$  と 1 個の  $Ca^{2+}$  を交換輸送している細胞膜イオントランスポーターである. この輸送体は, 通常, 細胞膜を介する  $Na^+$  の濃度勾配に従って  $Na^+$  は細胞内へ,  $Ca^{2+}$  は細胞外へ汲み出す役割を担っているが (フォワードモード), 病態的で特殊な状況下では逆に細胞外から  $Ca^{2+}$  を流入する逆転現象が起こる (リバースモード)<sup>17)</sup>. 今回, Sta. 群と比較して Str. 群で NCX1 mRNA が強く発現していた (Fig. 3). 本実験の伸展条件が正常の細胞機能範囲より大きな伸展であるとすれば, 本来の NCX1 が有する働きとは逆の細胞内へ  $Ca^{2+}$  を流入するリバースモードになっている可能性は否定できない. しかしながら, 今回と同条件下で培養した頭蓋冠由来の骨芽細胞で細胞数や DNA 合成の増加, ALP

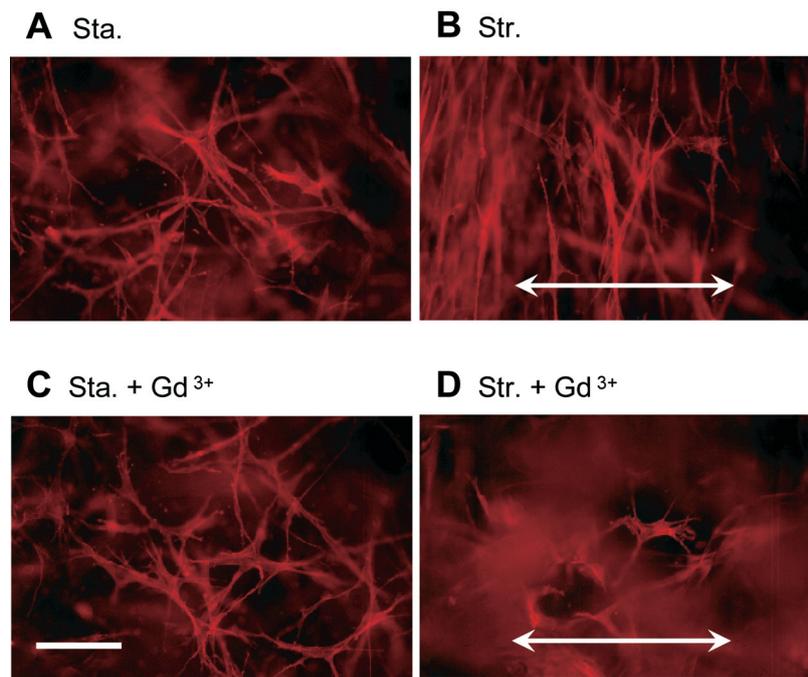


Fig. 4 Osteoblastic cells (MC3T3E-1 cell) embedded in collagen gel matrix were photographed using a conventional fluorescence microscope after three days of culturing. Actin structure was visualized by staining with rhodamine-phalloidin. The cells were cultured with (B and D) or without (A and C) mechanical stimulation (1 Hz for 15 min, three times a day). The effects of  $10\ \mu\text{M}$  gadolinium ( $\text{Gd}^{3+}$ ) administration were shown in the panels of C and D. In the Str. group, cells were long and slender, and oriented perpendicular to the direction of stretching (B). The effects of stretching were abolished by the addition of  $\text{Gd}^{3+}$  into the culture media (D). Bidirectional arrows in B and D indicate the direction of stretching. Bar =  $50\ \mu\text{m}$ .

活性の上昇などが観察された<sup>7)</sup>ことを考慮すると、本実験の伸展刺激は非生理的なものとは考えにくく、NCX1 mRNA 発現上昇はフォワードモード活性化（促進）を引き起こすものと考えられる。現在、NCX1 の特異的阻害剤 (KB-R7943) が発見され、研究が進みはじめている。KB-R7943 は NCX1 の  $\text{Ca}^{2+}$  のリバースモードのみを阻害する特徴がある<sup>17)</sup>。KB-R7943 を用いた実験を行えば、細胞膜伸展の強弱による  $\text{Ca}^{2+}$  流入機構の逆転現象についてより明確になると思われる。

コラーゲンを直接伸展する Str. 群だけでなく、Sha. 群においても NCX1 mRNA 発現が僅かに観察された。骨芽細胞系を用いた単層培養において、機械的刺激に呼応した NCX1 発現に着目した報告はない。本実験において、Sha. 群における発現が確認されたメカニズムは不明であるが、おそらくコラーゲンゲルが培地内を水平移動することで、ゲル表面の細胞にずり応力 (shear stress) が起こり影響したのではないだろうか。

Fig. 4 および 5 に示したように、Str. 群では細胞が伸展方向に対し直角に配列し、F-アクチン線維のローダミンファロイジン染色像では蛍光が非常に強く観察された。この細胞形態および細胞骨格の変化は単層培養系に

においても観察されている。Naruse らはフィブロネクチンでコートしたシリコン膜上で血管内皮細胞を用いて伸展刺激した結果、1分以内で  $\text{Ca}^{2+}$  の細胞内上昇と2時間後に細胞配列の変化が始まり4時間で規則的に配列したと報告<sup>22)</sup>している。今回は伸展開始3日目の観察で、細胞形態および細胞骨格の変化に関して単層培養系と時間的に大きなずれがあるが、我々も同様の結果を得たことから、機械的刺激と細胞骨格に密接な関係があることが示唆された。時間的なずれが生じた原因は不明であるが、シリコン膜上の単層培養に対してコラーゲンゲル内という3次元的环境と細胞に対する伸展力の加わり方の違いが関与しているのではないだろうか。しかしながら、細胞形態ならびに配列の方向性がどのような機構で調整されているかについては、詳細な報告はない。

機械的刺激を用いた実験系においてメカノセンシティブな SA チャネルの  $\text{Ca}^{2+}$  シグナル伝達系に対する役割は大きい。SA チャネル阻害薬である  $\text{Gd}^{3+}$  の培養液への添加は機械的刺激により引き起こされた細胞内への  $\text{Ca}^{2+}$  の流入を特異的に阻害する。近年、酸や熱によって活性化されるカプサイシン受容体として発見された TRP チャネル<sup>23,24)</sup> が注目されている。このサブファミ

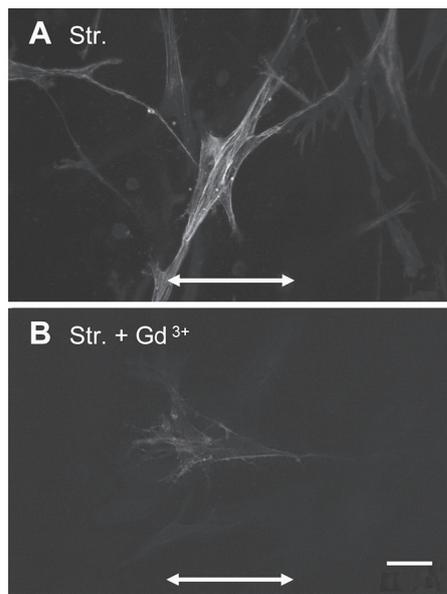


Fig. 5 Osteoblastic cells (MC3T3E-1 cell) embedded in collagen gel matrix were photographed using a confocal laser scanning microscope after three days of culturing. Actin structure was visualized by staining with rhodamine-phalloidin. The pictures are z-stacks made of ten sequential images taken at  $2.0\ \mu\text{m}$  intervals in each group. The cells in the stretched group (Str.) were long and slender, and showed very strong fluorescent intensity (A). Despite the presence of stretching, morphological changes in the cells were not observed when gadolinium ( $\text{Gd}^{3+}$ ) was added into the medium (B), and the fluorescence intensity was much weaker compared with that of the stretched group (A). Bidirectional arrows in B and D indicate the direction of stretching. Bar =  $10\ \mu\text{m}$ .

リーである TRPV4 が SA チャネルと同一の可能性が有する。TRP チャネルは 6 回膜貫通領域を有する陽イオンチャネルであり、6 つのサブファミリーに分けられている<sup>24)</sup>。TRPV4 は機械的刺激に反応し、 $\text{Gd}^{3+}$  により阻害される<sup>25)</sup>。さらに TRPV4 欠損マウスでは、非荷重条件下に置かれた場合、通常起こる骨形成減少や骨吸収促進が起こらなかった<sup>26)</sup> ことから、機械的刺激と骨代謝の関与に重要な役割があると思われる。いずれにしても、Str. 群での細胞形態および F-アクチンの変化が  $\text{Gd}^{3+}$  により阻害されたことは  $\text{Ca}^{2+}$  をセカンドメッセンジャーとした細胞内シグナル伝達機構の活性化<sup>12)</sup> を  $\text{Gd}^{3+}$  が抑制したと考える。つまり  $\text{Ca}^{2+}$  流入が引き金となりストレスファイバーの再構成や再構築を誘導している可能性がある。今回の結果では伸展刺激により NCX1 発現が高まったが、その発現が SA チャネルに依存したものか、あるいは連動した影響なのか、不明である。今後、その

点を明らかにする必要がある。

もう 1 つのシグナル経路として考えられるものに接着分子であるインテグリンを含んだ接着班 (FAK も含む) からのシグナル伝達がある。機械的刺激によりインテグリン  $\alpha_3\beta_3$  の発現を増加する報告がある<sup>4,27)</sup>。しかし、このコラーゲンゲル内 3 次元培養法では、インテグリン  $\beta_1$  の局在は本実験では不明瞭であった (データ未掲載)。3 次元環境では積極的に接着する必要がないため、発現が抑えられているのかも知れない。また、細胞骨格の調整に重要な役割がある Rho ファミリー (Rho, Rac) についても大変興味深い。Rho-ROCK シグナル経路の研究も詳細な解析が進められており<sup>28)</sup>、機械的刺激による細胞形態応答の解明に必須の因子であると考えられる。今後の研究課題として重要であり、検討する予定である。

今回の結果から、骨芽細胞では機械的伸展刺激による細胞形態応答として、より生体に近い環境下である 3 次元培養法において細胞配列の変化と F-アクチンの構造変化が見られた。さらに機械的刺激により NCX1 を介する  $\text{Ca}^{2+}$  の流入機構を活性化させた。また SA チャネル活性化は F-アクチンの構造変化を引き起こし、細胞形態を変化させることが示唆された。

## 文 献

- 1) Banes AJ, Gilbert J, Taylor D, Monbureau O: A new vacuum-operated stress-providing instrument that applies static or variable duration cyclic tension or compression to cell *in vitro*. *J Cell Sci*, **75**: 35-42, 1985
- 2) Datta N, Pham QP, Sharma U, Sikavitsas VI, Jansen JA, Mikos AG.: *In vitro* generated extracellular matrix and fluid shear stress synergistically enhance 3D osteoblastic differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*, **103**: 2488-2493, 2006
- 3) Owan I, Burr DB, Turner CH, Qiu J, Tu Y, Onyia JE, Duncan RL: Mechanotransduction in bone: osteoblasts are more responsive to fluid forces than mechanical strain. *Am J Physiol*, **273**: C810-C815, 1997
- 4) Miyauchi A, Gotoh M, Kamioka H, Notoya K, Sekiya H, Takagi Y, Yoshimoto Y, Ishikawa H, Chihara K, Takano-Yamamoto T, Fujita T, Mikuni-Takagaki Y:  $\alpha_3\beta_3$  Integrin ligands enhance volume-sensitive calcium influx in mechanically stretched osteocytes. *J Bone Miner Metab*, **24**: 498-504, 2006
- 5) Sun JS, Hong RC, Chang WHS, Chen LT, Lin FH, Liu HC: *In vitro* effects of low-intensity ultrasound stimulation on the bone cells. *J Biomed Mater Res*, **57**: 449-456, 2001
- 6) Shimizu N, Yamaguchi M, Goseki T, Shibata Y, Takiguchi H, Iwasawa T, Abiko Y: Inhibition of prostaglandin  $\text{E}_2$  and interleukin  $1\beta$  production by low-power laser irradiation in stretched human

- periodontal ligament cells. *J Dent Res*, **74**: 1382–1388, 1995
- 7) Sakai N, Suzuki K, Saito S, Shibasaki Y, Yamada S: Effects of mechanical stimulation on cultured cells in a collagen gel matrix. —In the new mechanical cell-stimulator—. *Biological Mechanisms of Tooth Movement and Craniofacial Adaptation*. In Davidovitch Z, Norton LA (eds): Harvard Soc., for the Adv. of Orthodontics, Boston, USA, 1996, EBSCO media, pp. 173–181
  - 8) Kawata A, Mikuni-Takagaki Y: Mechanotransduction in stretched osteocytes —Temporal expression of immediate early and other gene. *Biochem Biophys Res Commun*, **246**: 404–408, 1998
  - 9) Elliot KJ, Millward-Sadler SJ, Wright MO, Robb JE, Wallace WHB, Salter DM: Effects of methotrexate on human bone cell responses to mechanical stimulation. *Rheumatology*, **43**: 1226–1231, 2004
  - 10) Binderman I, Zor U, Alivn M, Zvi S, Arie H, Dalia S: The transduction of mechanical force into biochemical events in bone cells may involve activation of phospholipase A2. *Calcif Tissue Int*, **42**: 261–266, 1988
  - 11) Yah CK, Rodan GA: Tensile forces enhance prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis in osteoblastic cells grown on collagen ribbons. *Calcif Tissue Int*, **36**: S67–S71, 1984
  - 12) Ryder KD, Duncan RL: Parathyroid hormone modulates the response of osteoblast-like cells to mechanical stimulation. *Calcif Tissue Int*, **67**: 241–246, 2000
  - 13) Plotkin LI, Mathov I, Aguirre JI, Parfitt AM, Manolagas SC, Bellido T: Mechanical stimulation prevents osteocyte apoptosis: requirement of integrins, Src kinases, and ERKs. *Am J Physiol Cell Physiol*, **289**: C633–C643, 2005
  - 14) Arnsdort EJ, Tummala P, Kwon RY, Jacobs CR: Mechanically induced osteogenic differentiation —the role of RhoA, ROCK II and cytoskeletal dynamics. *J Cell Sci*, **122**: 546–552, 2008
  - 15) Ruknudin A, Sachs F, Bustamante JO: Stretch-activated ion channels in tissue-cultured chick heart. *Am J Physiol*, **264**: H960–H972, 1993
  - 16) Lee J, Ishihara A, Oxford G, Johnson B, Jacobson K: Regulation of cell movement is mediated by stretch-activated calcium channels. *Nature*, **400**: 382–386, 1999
  - 17) Iwamoto T, Kita S: Development and application of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange inhibitors. *Molecular and Cellular Biochem*, **259**: 157–161, 2004
  - 18) Donna M, Sosnoski N, Gay CV: NCX3 is a major functional isoform of the sodium-calcium exchanger in osteoblasts. *J Cellular Biochem*, **103**: 1101–1110, 2008
  - 19) Yamazaki T, Tobe K, Hoh E, Maemura K, Kaida T, Komuro I, Tamemoto H, Kadowaki T, Nagai R, Yazaki Y: Mechanical loading activates mitogen-activated protein kinase and S6 peptide kinase in cultured rat cardiac myocytes. *J Biol Chem*, **268**: 12069–12076, 1993
  - 20) Resnick N, Collins T, Atkinson W, Bonthron DT, Dewey CF Jr, Gimbrone MA Jr.: Platelet-derived growth factor B chain promoter contains a cis-acting fluid shear-stress-responsive element. *Proc Natl Acad Sci USA*, **15**: 4591–4595, 1993
  - 21) Hans R, Roland V, Helmut D: Effects of  $\alpha$ -adrenergic stimulation on the sarcolemmal Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-exchanger in adult rat ventricular cardiocytes. *Cardiovasc Res*, **36**: 216–222, 1997
  - 22) Naruse K, Sokabe M: Involvement of stretch-activated ion channels in Ca<sup>2+</sup> mobilization to mechanical stretch in endothelial cells. *Am J Physiol*, **264**: C1037–C1044, 1993
  - 23) Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D: The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, **389**: 816–824, 1997
  - 24) Nilius B, Owsianik G, Voets T: Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol Rev*, **87**: 165–217, 2007
  - 25) Suzuki M, Mizuno A, Kodaira K, Imai M: Impaired pressure sensation in mice lacking TRPV4. *J Biol Chem*, **278**: 22664–22668, 2003
  - 26) Mizoguchi F, Mizuno A, Hayata T, Nakashima K, Heller S, Ushida T, Sokabe M, Miyasaka N, Suzuki M, Ezura Y, Noda M: Transient receptor potential vanilloid 4 deficiency suppresses unloading-induced bone loss. *J Cell Physiol*, **216**: 47–53, 2008
  - 27) Katsumi A, Naoe T, Matsushita T, Kaibuchi K, Schwartz MA: Integrin activation and matrix binding mediate cellular responses to mechanical stretch. *J Biol Chem*, **280**: 16546–16549, 2005
  - 28) Riento K, Ridley AJ: Multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**: 446–456, 2003

## Effects of Mechanical Stimulation on the Expression of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> Exchanger mRNA and Orientation of F-actin Filaments in Cultured Osteoblastic Cells

Nobuhiro Sakai, Keiko Suzuki, Tomio Morohashi  
and Shoji Yamada

*Department of Pharmacology, Showa University School of Dentistry  
1-5-8 Hatanodai, Shinagawa-ku, Tokyo, 142-8555 Japan*

(Received January 22, 2010 ; Accepted for publication April 14, 2010)

**Abstract** : It is well known that the application of physiological mechanical stress to skeletal tissue is important in regulating bone remodeling and modeling. The aim of this study is to examine the expression of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger (NCX1) mRNA and the activation of stretch-activated (SA) Ca<sup>2+</sup> channels when three-dimensional strain is applied to osteoblast-like cells (MC3T3-E1 cell). The cells were mixed with collagen solution at a cell density of  $6 \times 10^5$  cells/ml and layered on nylon mesh, then pre-incubated in  $\alpha$ MEM containing 10% fetal bovine serum. After 24 hours of pre-incubation, cells in the collagen gel were incubated for up to three days with or without intermittent mechanical stimulation (1 Hz, 10% stretch, 15 min, three times a day) in the presence or absence of Gd<sup>3+</sup>, an inhibitor of SA channel. The expression of NCX1 mRNA was assessed using RT-PCR, and cells were examined using a confocal laser microscope after visualizing actin filaments using rhodamine-phalloidin staining. Accelerated NCX1 mRNA expression was observed in the stretched cells. The mechanical strain also caused the cells to change shape and orient perpendicular to the direction of stretching. Consistent with the morphological changes of the cells, strong intensity of the staining for actin filaments was observed in the stretched group, which was abolished by the addition of Gd<sup>3+</sup>. Our results suggest that the mechanical strain induces the Ca<sup>2+</sup> influx through activation of the SA channel and NCX1 resulting in the morphological changes in osteoblastic cells.

**Key words** : mechanical stimulation, osteoblast, Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger, stretch-activated (SA) channel, three-dimensional strain.